

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	12 AUG 1998
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die Anmelderin Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts in Heidelberg, Neckar/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mutierter OKT3-Antikörper"

am 23. Mai 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Nietiedt



Aktenzeichen: 197 21 700.1

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
Unser Zeichen: K 2420 - hu / wd

Mutierter OKT3-Antikörper

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

OKT3 ist ein aus Maus stammender monoklonaler Antikörper vom IgG 2a-Typ, der ein Epitop einer ϵ -Untereinheit des menschlichen CD3-Komplexes erkennt (Kung et al., Science 206, S. 347-349 (1979); Van Wauwe et al., J. Immunol. 124, S. 2708-2713 (1980); Transy et al., Eur. J. Immunol. 19, S. 947-950 (1989)). Das Verfahren, den monoklonalen Antikörper aus dem entsprechenden Hybridom zu erhalten, ist in diesen Druckschriften im Detail beschrieben. Außerdem wurde die OKT3 produzierende Hybridomazelllinie am 26. April 1979 unter der ATCC-Nummer CRL 8001 bei der American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, 200852 von der Inhaberin des EP-Patents 0 018 795 hinterlegt. OKT3 wird seit langem benutzt, um eine T-Zellantwort zu unterdrücken und dadurch die Abstoßung von Transplantaten zu verhindern (Thistlethwaite et al., Transplantation 38, S. 695-701 (1984); Woodle et al., Transplantation 51, S. 1207-1212 (1991)). Andererseits kann durch OKT3 auch eine T-Zell-Aktivierung und Proliferation ausgelöst werden, die Effektorzellen anregt, was bei der adoptiven Krebs-Immuntherapie eingesetzt werden kann (Yannely et al., J. Immunol. Meth. 1, S. 91-100 (1990)). OKT3 wurde sowohl alleine als auch als Komponente eines bispezifischen Antikörpers eingesetzt, um cytotoxische T-Lymphozyten gegen Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen zu richten (Nitta et al., Lancet 335, S. 368-376 (1990); Sanna et al., Bio/Technology 13, S. 1221-1224 (1995)). Außerdem sind auch humanisierte Versionen des OKT3-monoklonalen Antikörpers, die in COS-Zellen exprimiert wurden, bekannt (Woodle et al., J. Immunol. 148, S. 2756-2763 (1992); Adair et al., Human. Antibod. Hybridomas, S. 41-47 (1994)). Bisher bestand aber das Problem, daß OKT3 keine ausreichende Stabilität aufweist und insbesondere sich nicht in bekannten

rekombinanten Expressionssystemen stabil und in genügender Menge exprimieren läßt.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, OKT3 rekombinant zu exprimieren und einen Antikörper zu erhalten, der eine befriedigende Stabilität aufweist.

Die Aufgabe wird durch die Gegenstände der Patentansprüche gelöst.

Von den Erfindern wurde gefunden, daß durch Einbringen einer Punktmutation an Position H100A der Aminosäuresequenz von OKT3 die Stabilität um ein Vielfaches zunimmt. Diese Punktmutation betrifft den Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure, bevorzugt Serin, in der Aminosäuresequenz von OKT3.

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers wird von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 ausgegangen. Die cDNA wird nach den dem Fachmann bekannten Methoden, die beispielsweise in Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994) beschrieben wurden, hergestellt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA kann mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer, z.B. mittels der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt werden (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, können beispielsweise der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114 (1995), verwendet werden.

Die amplifizierte DNA wird danach in einen für die Sequenzierung und für "site-specific mutagenesis" geeigneten Vektor, wie er dem Fachmann bestens be-

kannt sind, inseriert. Beispielsweise kann der von der Firma Stratagene vertriebene Vektor pCR-Skript SK(+) verwendet werden. Mutationen werden in der von OKT3 stammenden v_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht. Die dafür notwendigen Bedingungen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise auch in Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987) beschrieben. Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein) wird geeigneterweise unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt, falls ein Austausch gegen Serin an dieser Position ausgeführt werden soll.

Die so veränderte DNA kann danach in einen Vektor bzw. Expressionsvektor kloniert werden. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors sind dies pGEMEX, pUC-Derivate oder pET3b. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad 1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4 anzugegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-1. Die Expression in E. coli ist erfindungsgemäß bevorzugt, wofür vorzugsweise der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996) eingesetzt wird, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als NcoI/BamHI DNA-Fragment insertiert ist. Es kommt zur Expression eines an der Position 100 A (Kabat-Nummerierungssystem) mutierten einzelkettigen Antikörpers OKT3, der die in Fig. 2 gezeigte Sequenz aufweist.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E. coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BI21 und SG 13009, den Hefestamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und Hela sowie die Insektenzellen sf9. Bevorzugt ist die Verwendung der von der Firma Stratagene vertriebenen XL1-Blue E. coli-Zellen.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine DNA in einen Expressionsvektor

inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden inseriert werden kann, so daß die DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann, beispielsweise in Form eines His-Fusionsproteins. Die dafür notwendige Information ist im vorzugsweise verwendeten Plasmid pHOG21 enthalten. Weiter kann die mutierte Form von OKT3 in Form eines bispezifischen Antikörpers, z.B. in Verbindung mit einem Antikörper gegen menschlichen CD19-Komplex vorliegen. Die Sequenz eines solchen bispezifischen Antikörpers ist in Fig. 3 gezeigt.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie mittels rekombinanter Methoden in ausreichender Menge hergestellt werden können und eine im Vergleich zum unmutierten monoklonalen Antikörper OKT3 größere Stabilität aufweist. Diese äußert sich beispielsweise darin, daß der mutierte Antikörper auch noch nach einem Monat Lagerung bei 4°C in PBS kaum von seiner ursprünglichen Bindungsaffinität eingebüßt hat, wohingegen OKT3 unter diesen Bedingungen bereits deutlich an Bindungsaffinität verloren hat (46%). Außerdem hat der erfindungsgemäße Antikörper den Vorteil, daß er als Einzelkettenantikörper (scFv) eine schnellere Blut-Clearance und eine bessere Tumورpenetration aufweist. Weiter sind ScFv's sehr nützliche Moleküle, um Arzneistoffe, Toxine oder Radionuklide an Tumorstellen zu bringen, was in der Tumordiagnostik und -therapie wichtig ist.

Die vorliegende Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben.

Fig. 1: Plasmid pHOG21

wobei die verwendeten Abkürzungen folgende Bedeutungen haben:

Ap ^R :	Ampicillin-Resistenzgen
c-myc:	Sequenz codierend für ein Epitop, das durch den monoklonalen Antikörper 9E10 (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, Großbritannien) erkannt wird
ColE1:	Ursprung der DNA-Replikation

fl IG:	Intergene Region des f1-Phagen
His ₆ :	Sequenz codierend für 6 Histidinreste
linker:	Sequenz codierend für 17 Aminosäuren, die die v _H - und v _L -Domäne verbindet
pelB:	Signalpeptidsequenz für bakterielle Pektatlyase
P/O:	Wildtyp-Lac-Promotor/Operator

Fig. 2: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten OKT3-Einzelkettenantikörpers

durchgehende Linie: Start-Aminosäure (davor Leader-Sequenz)
gestrichelte Linie: Aminosäurenaustausch Cys ---> Ser

Fig. 3: Bispezifischer Antikörper zusammengesetzt aus mutiertem OKT3 und anti-CD19

Die Erfindung wird weiter anhand des Beispiels erläutert.

BEISPIEL 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Die Isololation von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und die cDNA-Synthese wurde, wie in "Dübel et al., J. Immunol. Methods 175, S. 89-95 (1994)" beschrieben durchgeführt. Die für die variable Domäne der leichten Kette kodierende DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer Bi5 and Bi8, die an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne der κ -Kette und die "Framework 1 (FR1)-Region der variablen Domäne der κ -Kette hybridisieren, hergestellt (Dübel et al., vgl. vorstehend). Für die Amplifikation der DNA, die für die variable Domäne der schweren Kette codiert, wurde der Primer Bi4, der an den aminoterminalen Teil der konstanten Domäne 1 der γ -Kette hybridisiert (Dübel et al., vgl. vorstehend) und der Primer Bi3f, der an die FR1-Region der schweren Kette hybridisiert (Gotter et al., Tumor Targeting 1, S. 107-114

(1995), verwendet. Das 50 μ l Reaktionsgemisch enthielt 10 pmol jedes Primers und 50 ng Hybridoma cDNA, 100 μ M jedes der dNTPs, 1x Vent-Puffer (Boehringer Mannheim), 5 μ g BSA und 1 U Vent DNA-Polymerase. Es wurden 30 Zyklen je 1 Minute bei 95°C, 1 Min. bei 55°C und 2 Minuten bei 75°C in einem PCR-Thermozykler durchgeführt. Die amplifizierte DNA wurde mit einem QIA-quick PCR-Reinigungskit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Die amplifizierte DNA wurde danach in den von der Firma Stratagene vertriebenen Vektor pCR-Skript SK(+), der mit dem Restriktionsenzym SrfI geschnitten worden war, "blunt-end" ligiert. Mutationen wurden in der von OKT3 stammenden v_H -Domäne durch gerichtete Mutagenese ("site specific mutagenesis") eingebracht (Kunkel et al., Meth. Enzymol. 154, S. 367-382 (1987)). Die Aminosäuresubstitution an der Position H100A von OKT3 (Austausch von Cystein gegen Serin) wurde unter Verwendung des Primers SK1 5'-GTAGT-CAAGGCTGTAATGATCATC durchgeführt.

Für die Expression der erhaltenen mutierten DNA wurde der in Fig.1 gezeigte Vektor pHOG21 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods 196, S. 51-62 (1996)) eingesetzt, worin das mutierte OKT3-Einzelketten(scFv)-Gen als NcoI/BamHI DNA-Fragment inseriert ist. XL1-Blue E. coli-Zellen (Stratagene) wurden mit diesem Expressionsvektor transformiert und über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C wachengelassen. Verdünnungen (1:50) der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden bei 37°C unter Schütteln bei 37°C wachengelassen. Sobald die Kulturen OD₆₀₀ = 0,8 erreichten, wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 1500 g für 10 Minuten and 20°C pelletiert und im gleichen Volumen frischem 2xYT-Medium enthaltend 50 μ g/ml Ampicillin und 0,4 M Sucrose resuspendiert. Es wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt und das Wachstum bei Raumtemperatur für 20 Std. fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000g für 10 Minuten und 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde auf Eis aufbewahrt. Um lösliche periplasmatische Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in eiskaltem 50 mM Tris-HCl, 20% Sucrose, 1 mM EDTA, pH 8,0 (5%

des Ursprungsvolumens) aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Rühren wurden Spheroplasten bei 30000 g für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Spheroplasten plus unlösliches periplasmatisches Material als Pellet anfielen. Der vorstehend auf Eis aufbewahrte Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden kombiniert und durch eine zusätzliche Zentrifugation (30000 g, 4°C, 40 Min.) geklärt. Nach Filtrationen durch Glasfilter mit einer Porengröße von 10-16 µm und dann 0,2 µm wurde das Volumen 10-fach durch Konzentration mit Amicon YM10 Membranen (Amicon, Witten). Der konzentrierte Überstand wurde durch Zentrifugation geklärt und gegen 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 bei 4°C dialysiert. Immobilisierte Metall-Affinitätschromatografie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule von chelatisierender Sepharose (Pharmacia) beladen mit Ni²⁺ und equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) durchgeführt. Auf der Säule adsorbiertes Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0 eluiert. Nach Pufferwechsel zu 50 mM MES, pH 6,0 wurde das Protein weiter auf einer Mono S Ionenaustauschsäule (Pharmacia) gereinigt. Der erfindungsgemäße gereinigte scFv-Antikörper wurde in PBS (15 mM Natriumphosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,4) dialysiert. Für eine längere Aufbewahrung wurde der Antikörper in Anwesenheit von BSA (Endkonzentration 10 mg/ml) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Patentansprüche

- 5
- 1) Monoklonaler Antikörper gekennzeichnet durch einen Austausch von Cystein gegen eine andere polare Aminosäure an Position H100A des unter der Bezeichnung bekannten Antikörpers OKT3.
- 10
- 2) Monoklonaler Antikörper, dadurch gekennzeichnet, daß die polare Aminosäure Serin ist.
- 3) Monoklonaler Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß dieser die in Fig. 2 angegebene Sequenz aufweist.
- 15
- 4) Verfahren zur Herstellung des monoklonaler Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- 20
- a) Gewinnen von mRNA aus frisch subklonierten Hybridomazellen von OKT3 und Umschreibung zu cDNA
- b) Amplifikation der für die variablen Domänen der leichten und schweren Kette kodierenden DNA mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer,
- 25
- c) Klonierung der unter b) erhaltenen DNA in einen zur gerichteten Mutagenese geeigneten Vektor sowie Einführung der gewünschten Mutation unter Verwendung geeigneter Primer,
- 30
- d) Insertion der unter c) erhaltenen mutierten DNA in einem Expressionsvektor und Expression in einem geeigneten Expressionssystem.

- 5) Verfahren nach Anspruch 4, wobei die in Schritt b) verwendeten Primer Bi5, Bi8, Bi4 und Bi3f sind.
- 5 6) Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei der in Schritt c) verwendete Vektor pCR-Skript SK(+) ist.
- 7) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei in Schritt c) der Primer SK1 5'-GTAGTCAAGGCTGTAATGATCATC verwendet wird.
- 10 8) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei der in Schritt d) verwendete Expressionsvektor pHOG21 ist.
- 9) Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Expression in XL1-Blue E. coli-Zellen erfolgt.
- 15 10) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Verminderung oder Ausschaltung einer Transplantatabstoßung durch einen Organtransplantatempfänger.
- 20 11) Verwendung des monoklonalen Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in der Tumordiagnostik oder -therapie.

Zusammenfassung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft einen durch eine Punktmutation an Position H100A mutierten OKT3-Antikörper, Verfahren zu seiner Herstellung sowie seine Verwendung.

Fig. 1

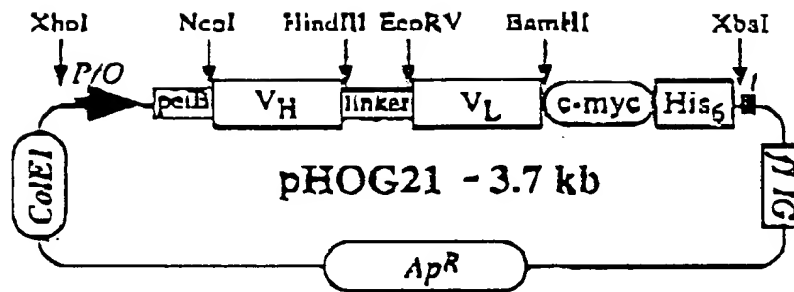


Fig. 2

EcoRI FBS PalB leader

1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCT

1 MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAla

NcoI VH anti-CD3 Frame-H1

79 CAGCCGCGCCATGGCCAGCTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCC

18 GlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer

CDR-H1 Frame-H2

TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCAGTGGGTAAACAGAGCCCTGGACAGGGTCTGGAA

CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu

CDR-H2

232 TGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACA

59 TrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThr

Frame-H3

301 TTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTAC

92 LeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr

CDR-H3 Frame-H4

379 TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG

128 CysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrSerLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSerA

CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1

452 CCAAAACAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG

142 LaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleLeuLeuThrGlnThrProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGln

CDR-L1

529 AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACC

168 ArgAlaThrIleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrLeuAsnTrpTyrC

Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3

AACAGATCCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAGTTTCTGGGATCCCACCCAGG

InGlnIleProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnLeuValSerGlyIleProProArg

TTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCAC

426 PheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHisProValGluLysValAspAlaAlaThrTyrHis

CDR-L3 Frame-L4 C kappa NotI

751 TGTGAGCAAAGTACTGAGGATCCGTGGACGTTGGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGGG

242 CysGlnGlnSerThrGluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla

o-myc epitope His6 tail BgIII

826 GCGGCTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATCACTAAAGAT

267 AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHisHis...

Diabody of anti-CD19 and anti-CD3 (mutated OKT3)

EcoRI RBS PstI leader
 1 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCT
 1 MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAla
 NcoI + VH anti-CD3 Frame-H1
 79 CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCACTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCC
 18 GlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaArgProGlyAlaSerValLysMetSer
 CDR-H1 Frame-H2
 157 TGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAA
 14 CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrArgTyrThrMetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu
 CDR-H2
 232 TGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTATACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACA
 69 TrpIleGlyTyrIleAsnProSerArgGlyTyrThrAsnTyrAsnGlnLysPheLysAspLysAlaThr
 Frame-H3
 301 TTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTAC
 92 LeuThrThrAspLysSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr
 CDR-H3 Frame-H4
 379 TGTCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG
 118 CysAlaArgTyrTyrAspAspHisTyrSerLeuAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSerA
 CH1 Linker VL anti-CD19 Frame-L1
 452 CCAAAACAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACCACAACTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAG
 142 laLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleLeuLeuThrGlnThrProAlaSerLeuAlaValSerLeuGlyGln
 CDR-L1
 529 AGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGATTATGATGGTGTAGTATTATTTGAACTGGTACC
 168 ArgAlaThrIleSerCysLysAlaSerGlnSerValAspTyrAspGlyAspSerTyrLeuAsnTrpTyrG
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3
 19 AACAGATTCAGGACAGCCACCAAACTCCTCATCTATGATGCATCCAATCTAAGTTTCTGGGATCCACCCAGG
 11 InGlnIleProGlyGlnProProLysLeuLeuIleTyrAspAlaSerAsnLeuValSerGlyIleProProArg
 673 TTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCAC
 216 PheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuAsnIleHisProValGluLysValAspAlaAlaThrTyrHis
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa NotI
 751 TGTCAAGAAAGTACTGAGGATCCCTGGAGCTTGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGG
 242 CysGlnGlnSerThrGluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAla
 a-myc epitope His6 tail BgIII
 826 GCCGCTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATTACTAAAGAT
 267 AlaAlaGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis...
 RBS PstI leader
 899 CTATTAAAGAGGAGAAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGCTTGCTGCTGGCAGCTCAGC
 1 MetLysTyrLeuLeuProThrAlaAlaAlaGlyLeuLeuLeuLeuAlaAlaGlnP
 NcoI + VH anti-CD19 Frame-H1
 977 CGGCCATGGCGCAGGTGCAGCTGCAGCACTCTGGGGCTGAGCTGGTGGAGCCCTGGGTCTCAGTGAAGATTTCTGCA
 19 roAlaMetAlaGlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlySerSerValLysIleSerCysL
 CDR-H1 Frame-H2
 1055 AGGCTTCTGGCTATGCATTGATGATGCTGATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCCTGGACAGGGTCTTGAGTGA
 45 ysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSerTyrTrpMetAsnTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpI
 CDR-H2
 1120 TTGGACAGATTTGGCCTGGAGATGGTGCATACTAATACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGA
 70 ledGlyGlnIleTrpProGlyAspGlyAspThrAsnTyrAsnGlyLysPheLysGlyLysAlaThrLeuT
 Frame-H3
 9 CTGCAGACGAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTG
 93 hrAlaAspGluSerSerSerThrAlaTyrMetGlnLeuSerSerLeuAlaSerGluAspSerAlaValTyrPheCysA
 CDR-H3 Frame-H4
 1277 CAAGACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 119 laArgArgGluThrThrThrValGlyArgTyrTyrAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerVa
 CH1 Linker VL anti-CD3 Frame-L1
 1347 CACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCGTCTCAGTCTCAGCAATCATGTCTG
 142 lThrValSerSerAlaLysThrThrProLysLeuGlyGlyAspIleValLeuThrGlnSerProAlaIleMetSerA
 CDR-L1 Frame-L2
 1424 CATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAAGTGGTACCAGCA
 168 laSerProGlyGluLysValThrMetThrCysSerAlaSerSerSerValSerTyrMetAsnTrpTyrGlnG
 CDR-L2 Frame-L3
 1497 GAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGCAATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCA
 192 nLysSerGlyThrSerProLysArgTrpIleTyrAspThrSerLysLeuAlaSerGlyValProAlaHisPheA
 1571 GGGGCACTGGGTCTGGACCTCTACTCTCACAATCAGCCGATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCC
 217 rgGlySerGlySerGlyThrSerTyrSerLeuThrIleSerGlyMetGluAlaGluAspAlaAlaThrTyrTyrCysG
 CDR-L3 Frame-L4 C kappa
 1649 AGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTCCGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGCTGATAGTCCAGC
 243 InGlnTrpSerSerAsnProPheThrPheGlyS rGlyThrLysLeuGluIleAsnArgAlaAspThrAlaPr
 a-myc epitope His6 tail XbaI
 1722 AACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTAAACTCACATCACCATCACCATTACTAGAA
 267 cThrGlySerGluGlnLysLeuIleSerGluGluAspLeuAsnSerHisHisHisHisHisHis...